



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년06월11일
(11) 등록번호 10-1273333
(24) 등록일자 2013년06월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/11 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0075835

(22) 출원일자 2012년07월12일

심사청구일자 2012년07월12일

(56) 선행기술조사문헌

KR100822741 B1

Mol. Biol. Rep, Vol. 39, pp. 3153-3160
(2011.07.15.)

Mol. Biol. Rep, Vol. 39, pp. 2677-2682
(2011.06.21.)

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (공동, 충남대학교)

(72) 발명자

이준현

대전광역시 유성구 어은로 57, 103동 606호 (어은동, 한빛아파트)

조철훈

대전광역시 유성구 어은로 57, 120동 1502호 (어은동, 한빛아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 천지

전체 청구항 수 : 총 8 항

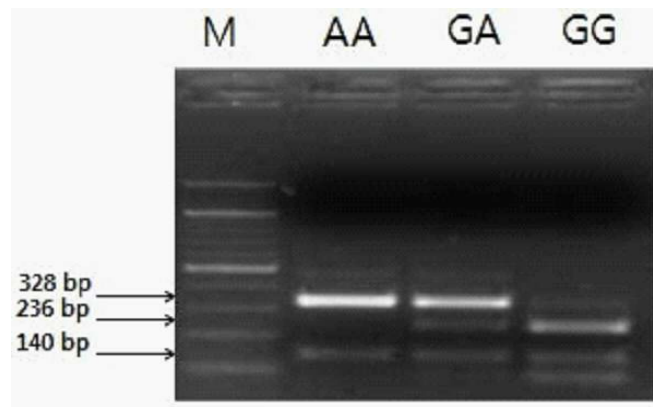
심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 **육용계의 지방산 조성을 확인하기 위한 신규 프라이머 세트 및 이를 이용한 육용계의 선별 방법**

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 불포화지방산 함량이 높은 닭 선별용 프라이머 세트, 닭의 SCD(Stearoyl-CoA desaturase) 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형이 동형접합체 유전자형인지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 불포화지방산 함량이 높은 닭을 선별하는 방법 또는 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트 및 불포화지방산 함량이 높은 닭의 유전자표식을 탐지하는 탐지수단을 포함하는 불포화지방산 함량이 높은 닭 판별 키트에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

디아마하라니

대전광역시 유성구 궁동 220 충남대학교 농업생명
공학관 214호

정우영

대전광역시 서구 신갈마로 46, 111동 401호 (내동,
롯데아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ907011032012

부처명 국립축산과학원

연구사업명 FTA 대응기술 개발사업

연구과제명 국가, 민간 보유 종자의 유전 특성 분석 및 특이마커 탐색

주관기관 충남대학교

연구기간 2011.03.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

- a) 판별 대상이 되는 닭으로부터 DNA 시료를 채취하는 단계;
 - b) 상기 DNA 시료 및 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 상기 DNA 시료를 증폭시키는 단계;
 - c) 상기 증폭 산물을 제한효소 *AciI*로 처리하는 단계; 및
 - d) 상기 제한효소 *AciI*로 처리한 처리물을 전기영동하여 닭의 SCD(*Stearoyl-CoA desaturase*) 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형이 동형접합체 유전자형인지 여부를 확인하는 단계를 포함하는
- 닭의 SCD(*Stearoyl-CoA desaturase*) 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형이 이형접합체 유전자형을 갖는 닭보다 불포화지방산 함량이 높은 닭을 선별하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 증폭시키는 단계는 상기 DNA 시료를 주형으로 하고, 상기 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 프라이머로 하여 PCR 반응을 수행하는 것을 특징으로 하는

닭의 SCD(*Stearoyl-CoA desaturase*) 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형이 이형접합체 유전자형을 갖는 닭보다 불포화지방산 함량이 높은 닭을 선별하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 동형접합체 유전자형은 AA형 또는 GG형인

닭의 SCD(*Stearoyl-CoA desaturase*) 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형이 이형접합체 유전자형을 갖는 닭보다 불포화지방산 함량이 높은 닭을 선별하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 동형접합체 유전자형은 GG형인

닭의 SCD(*Stearoyl-CoA desaturase*) 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형이 이형접합체 유전자형을 갖는 닭보다 불포화지방산 함량이 높은 닭을 선별하는 방법.

청구항 5

서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트;

판별 대상이 되는 닭으로부터 채취한 DNA 시료 및 상기 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 상기 DNA 시료를 증폭시키는 증폭수단;

상기 증폭수단에 의해 증폭된 DNA 시료를 제한효소 *AciI*로 처리할 수 있는 처리수단; 및

상기 제한효소 *AciI*로 처리한 처리물을 이용하여 닭의 SCD(*Stearoyl-CoA desaturase*) 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형이 동형접합체 유전자형인지 여부를 탐지하는 탐지수단

을 포함하는

닭의 SCD(*Stearoyl-CoA desaturase*) 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형이 이형접합체 유전자형을 갖는 닭보다 불포화지방산 함량이 높은 닭 판별 키트.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 동형접합체 유전자형은 AA형 또는 GG형인 것을 특징으로 하는

닭의 SCD(Stearoyl-CoA desaturase) 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형이 이형접합체 유전자형을 갖는 닭보다 불포화지방산 함량이 높은 닭 판별 키트.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 동형접합체 유전자형인지 여부를 탐지하는 탐지수단은 상기 제한효소로 처리한 처리물을 전기영동하여 유전자형을 확인할 수 있는 수단인 것을 특징으로 하는

닭의 SCD(Stearoyl-CoA desaturase) 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형이 이형접합체 유전자형을 갖는 닭보다 불포화지방산 함량이 높은 닭 판별 키트.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 전기영동하여 유전자형을 확인할 수 있는 수단은 아가로스 겔 또는 폴리아크릴아마이드 겔을 이용하여 전기영동한 후에, 상기 전기영동의 결과인 DNA 밴드의 수와 크기를 확인할 수 있는 수단인 것을 특징으로 하는

닭의 SCD(Stearoyl-CoA desaturase) 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형이 이형접합체 유전자형을 갖는 닭보다 불포화지방산 함량이 높은 닭 판별 키트.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 닭, 구체적으로 육용계의 지방산 조성을 확인하기 위한 유전자 마커 즉, 신규한 프라이머 세트 및 이를 이용한 육용계의 선별 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 사람이 섭취하는 지방산은 그 종류에 따라 콜레스테롤 상승이나 혈당치의 증가 등을 유발하여, 심혈관 질환이나 대사성 질환의 발병에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 특히, 라우르산(C12:0), 미리스트산(C14:0) 또는 팔미트산(C16:0) 등과 같은 포화지방산(Saturated Fatty Acids, SFA)의 과다 섭취는 심혈관 질환과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다. 한편, 이와 반대로 고도 불포화지방산(Polyunsaturated Fatty Acid, PUFA)이나 단가불포화지방산(MonoUnsaturated Fatty Acid, MUFA)의 많은 섭취는 저밀도 지단백질(LDL) 수용체의 활성을 증가시켜, LDL 콜레스테롤의 순환 농도를 감소시키는 것으로 보고되고 있다.

[0003] 최근, 건강지향적 생활습관의 강조에 따라 건강에 대한 관심이 높은 소비자에게 있어서, 육류 또는 고기의 선택 시 지방산의 구성은 매우 중요한 요소로 작용을 하고 있으며, 이러한 요구에 따라 지방산 조성이 좋은 고기를 찾는 연구는 계속적으로 중요시되고 있다.

[0004] 이러한 측면에서, 가금육은 쇠고기보다 낮은 비율의 포화지방산과 높은 고도불포화지방산, 특히 긴 사슬 오메가-3 에이코사펜타엔산(EPA)과 도코사헥사노엔산(DHA)을 함유하고 있다는 측면에서 건강지향적인 것으로 알려져 있다. 특히, 닭고기의 적색육은 다이어트 대체식품으로서 체내에서 아포리포단백질 B(apolipoprotein B)와 전체 콜레스테롤 수준을 감소시키는 것으로 보고되어 있으며, 건강지향적 소비자들은 백색육의 소비를 적색육으로 대체하고 있는 실정이다.

[0005] 따라서, 바람직한 지방산 조성을 포함한 고품질 육질을 지난 가축, 특히 가금육의 생산과 선별은 생산자와 연구자들의 중요한 개량의 목적이 되고 있다.

[0006] 바람직한 지방산 조성을 가지고 있는 동물들의 선별 및 생산을 위한 방법으로, 유전자형을 조사할 수 있는 마커 또는 프라이머 세트를 이용한 방법으로 마커도움 선발법(marker-assisted selection, MAS)이 제공되고 있다. 구체적으로, 상기 마커도움 선발법은 지방산 조성에 영향을 미치는 유전자를 직접적으로 선별하도록 함으로써 육종산업에서 응용되어 왔다.

[0007] 일 예로, SCD(Stearoyl-CoA desaturase)와 같은 지방산 조성에 영향을 미치는 특정 유전자의 유전자형을 확인할 수 있는 마커 또는 프라이머세트를 이용하여 특정 지방산 조성이 높은 개체를 선별하는 연구가 진행되고 있다.

[0008] 상기 SCD는 포유동물 지방세포에서 포화지방산을 단가 포화지방산(MUFA)으로 전환시키는 것을 촉진시키는 효소로, 포화지방산과 단가 포화지방산의 델타(Δ) 9 불포화반응을 촉진시킬 수 있고, 지방산 기질의 델타 9 위치에 cis-이중결합의 삽입에 의해 불포화지방산들의 합성에 기여하는 것으로 알려져 있다.

[0009] 그러나, 이러한 SCD 유전자는 주로 소와 관련되어 연구되고 있으며, 소의 지방산 조성과 SCD 유전자형이 밀접한 관련이 있다는 내용이 보고되어 있다. 또한, 돼지에 있어서 최근 연구에 의하면 SCD 유전자가 지방산 조성 과 숙성도에 큰 영향을 미치고 있다고 보고되었다.

[0010] 그러나, 닭에 있어서는 SCD 유전자의 지방산 조성에 미치는 영향에 대해서는 아직 관련 보고가 나오지 않고 있으며, SCD의 특정 유전자형 또는 유전자 다형성과 닭의 지방산 조성 사이의 연관관계에 대한 연구는 전혀 진행되어 있지 않은 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) KR 0822741 B
(특허문헌 0002) KR 2005-0094157 A

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명은 상기한 바와 같이, 불포화지방산 함량이 높아 품질이 우수한 계육을 생산할 수 있는 육용계를 선별하여 기존 육용계 생산능가의 문제점을 해결하기 위하여, 많은 육용계로부터 닭의 지방산 조성을 확인하기 위한 유전자 마커, 보다 구체적으로는 불포화지방산 함량이 높은 닭을 신속하고 정확하게 판별하기 위한 유전자마커를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 유전자마커를 이용하여 불포화지방산 함량이 높은 닭을 선별하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 불포화지방산 함량이 높은 닭을 선별할 수 있는 선별용 프라이머 세트를 제공한다
- [0015] 또한, 본 발명은 불포화지방산 함량이 높은 닭을 선별할 수 있는 선별방법을 제공한다. 상기 선별방법은 상기의 불포화지방산 함량이 높은 닭을 선별할 수 있는 선별용 프라이머 세트를 이용하는 것일 수 있다.
- [0016] 또한, 본 발명은 불포화지방산 함량이 높은 닭을 선별할 수 있는 선별키트를 제공한다. 상기 선별키트는 상기의 불포화지방산 함량이 높은 닭을 선별할 수 있는 선별용 프라이머 세트를 포함하는 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명자들은 닭의 지방산 조성과 관련된 유전자 마커, 구체적으로 불포화지방산 함량이 높은 닭을 선별할 수 있는 유전자 마커를 찾기 위한 연구를 통해, 닭의 SCD(Stearoyl-CoA desaturase) 유전자에 5개의 단일염기다형이 존재하고, 이 중 2번 엑손에 위치한 단일염기다형(SNP: Single Nucleotide Polymorphism)이 팔미톨레산(Palmitoleic acid, C16:1), 팔미트산(Palmitic acid, C16:0) 및 미리스트올레산(Myristoleic acid, C14:1) 함량과 높은 연관성이 있음을 확인하였으며, 이로부터 상기 2번 엑손에 위치한 단일염기다형을 확인할 수 있는 신규한 프라이머를 이용하여 동형접합체 유전형을 가지는 것을 확인하여, 신속하고 정확하게 불포화지방산 함량이 높은 계육을 생산할 수 있는 닭을 선별할 수 있다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0019] 본 발명의 일 측면에 있어서, 본 발명은 불포화지방산 함량이 높은 닭 선별용 프라이머 세트에 관한 것이다.
- [0020] 상기 프라이머 세트는 불포화지방산 함량 특히, 팔미톨레산(Palmitoleic acid, C16:1), 팔미트산(Palmitic acid, C16:0) 및 미리스트올레산(Myristoleic acid, C14:1) 함량과 관련하여 높은 연관성이 있는 마커 구체적으로, 유전자 마커를 이용하여 불포화지방산 함량이 높은 닭을 선별할 수 있는 것이다. 상기 유전자 마커는 닭의 SCD(Stearoyl-CoA desaturase) 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형에 관한 것일 수 있다.
- [0021] 이러한 측면에서, 상기 프라이머 세트는 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0022] 구체적으로, 상기 불포화지방산 함량이 높은 닭은 SCD(Stearoyl-CoA desaturase) 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형이 동형접합체 유전자형을 갖는 육용계일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 다른 측면에 있어서, 본 발명은 불포화지방산 함량이 높은 닭을 선별하는 방법, 구체적으로 불포화지방산 함량이 높은 계육을 생산할 수 있는 육용계를 선별하는 방법에 관한 것이다.
- [0024] 상기 선별 방법은 유전자형을 조사할 수 있는 마커 또는 프라이머 세트를 이용한 마커도움 선별법(marker-assisted selection, MAS), 구체적으로, 닭의 SCD(Stearoyl-CoA desaturase) 유전자와 관련된 마커 또는 프라이머 세트를 이용한 마커도움 선별법일 수 있다.
- [0025] 이러한 측면에서, 상기 불포화지방산 함량이 높은 닭을 선별하는 방법은 닭의 SCD(Stearoyl-CoA desaturase) 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형이 동형접합체 유전자형인지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0026] 구체적으로, 상기 동형접합체 유전자형인지 여부를 확인하는 단계는 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 이용하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 닭의 SCD 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형의 동형접합체 유전자형은 AA형 또는 GG형일 수 있다. 일 예로, 상기 단일염기다형의 동형접합체 유전자형은 GG형일 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은 a) 판별 대상이 되는 닭으로부터 DNA 시료를 채취하는 단계; b) 상기 DNA 시료 및 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 상기 DNA 시료를 증폭시키는 단계; c) 상기 증폭 산물을 제

한효소 처리하는 단계; 및 d) 상기 제한효소 처리한 처리물을 전기영동하여 유전자 형을 확인하는 단계를 포함하는 불포화지방산 함량이 높은 닭을 선별하는 방법일 수 있다.

[0028] 상기 DNA 시료는 상기 닭, 구체적으로 검색대상이 되는 육용계로부터 채취한 계육의 계놈 DNA(genome DNA)일 수 있고, 더 구체적으로는 상기 계놈 DNA로부터 분리한 닭의 SCD(Stearoyl-CoA desaturase) 유전자의 2번 엑손 또는 상기 계놈 DNA로부터 분리한 닭의 SCD(Stearoyl-CoA desaturase) 유전자의 2번 엑손에 해당하는 부위일 수 있다.

[0029] 상기 DNA 시료는 닭, 구체적으로 육용계로부터 채취한 DNA 시료일 수 있고, 보다 구체적으로, 닭의 혈액, 정액, 육즙 또는 계육의 조직으로부터 얻은 계놈 DNA(genomic DNA)일 수 있으며, 바람직하게는 계육의 조직으로부터 얻은 계놈 DNA일 수 있다.

[0030] 상기 닭의 SCD(Stearoyl-CoA desaturase) 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형이 동형접합체 유전자형인지 여부를 확인하는 단계는 상기 닭으로부터 채취된 DNA 시료 및 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 상기 DNA 시료를 증폭시키는 단계; 상기 증폭 산물을 제한효소 처리하는 단계; 및 상기 제한효소 처리한 처리물을 전기영동하여 유전자 형을 확인하는 단계를 포함하는 방법으로 수행할 수 있다.

[0031] 또한, 상기 닭의 SCD(Stearoyl-CoA desaturase) 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형이 동형접합체 유전자형인지 여부를 확인하는 단계는 유전자형을 조사할 수 있는 마커 또는 프라이머 세트를 이용한 방법으로 마커도움 선발 방법으로 수행할 수 있다.

[0032] 상기 마커도움 선발법은 상기 닭의 DNA 시료를 주형(template)으로 하고 상기 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 프라이머 세트를 프라이머로 하여 PCR 반응을 수행하고, 상기 PCR 반응 산물을 시퀀싱하여 염기서열을 확인하거나, 상기 PCR 반응산물을 제한효소로 처리한 후, 아가로스 겔(agarose gel)과 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel)을 이용하여 전기영동한 후에, 상기 전기영동의 결과인 DNA 밴드(DNA band)를 확인하는 방법으로 수행할 수 있다.

[0033] 상기 증폭시키는 단계는 상기 DNA 시료를 주형으로 하고, 상기 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 프라이머로 하여 PCR 반응을 통해 수행할 수 있다. 구체적으로, 상기 증폭시키는 단계는 상기 닭의 SCD(Stearoyl-CoA desaturase) 유전자의 2번 엑손을 주형으로 하고 상기 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 프라이머로 하여 PCR 반응을 통해 수행할 수 있다.

[0034] 상기 상기 증폭 산물을 제한효소 처리하는 단계에서 사용되는 제한효소는 *AciI*일 수 있다.

[0035] 구체적으로, 상기 유전자 형은 닭의 SCD(Stearoyl-CoA desaturase) 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형일 수 있다. 또한, 상기 유전자 형을 확인하는 단계는 상기 닭의 SCD(Stearoyl-CoA desaturase) 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형이 동형접합체 유전자형인 것을 확인하는 방법으로 수행할 수 있다. 상기 동형접합체 유전자형은 AA형 또는 GG형일 수 있으며, 일 예로, GG형일 수 있다.

[0036] 본 발명의 구체예에 있어서, 닭으로부터 채취한 시료의 PCR 반응산물을 제한효소로 처리한 결과를 전기영동한 결과, 닭의 SCD(Stearoyl-CoA desaturase) 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형이 동형접합체 유전자형인 경우, 밴드가 300 bp 내지 350 bp 크기, 구체적으로 325 bp 내지 330 bp 크기의 밴드 및 120 bp 내지 160bp 크기, 구체적으로 135 bp 내지 145 bp 크기의 밴드가 2개 확인되거나, 밴드가 220 bp 내지 250bp 크기, 구체적으로 230 bp 내지 240 bp 크기의 밴드, 120 bp 내지 160bp 크기, 구체적으로 135 bp 내지 145 bp 크기의 밴드 및 80 bp 내지 100 bp 크기, 구체적으로 90 bp 내지 95 bp 크기의 밴드가 3개 확인되는 것으로 확인될 수 있다.

[0037] 상기 결과로부터 일 예로 팔미톨레산이 다량 함유된 계육을 생산하는 육용계를 선택하고 싶은 경우, 220bp 내지 250bp 크기의 밴드, 120 bp 내지 160bp 크기의 밴드 및 80 bp 내지 100bp 크기의 밴드가 3개 확인되는 계육을 선택할 수 있다.

[0038] 또한, 본 발명의 다른 측면에 있어서, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트 및 불포화지방산 함량이 높은 닭의 유전자표식을 탐지하는 탐지수단을 포함하는 불포화지방산 함량이 높은 닭 판별 키트일 수 있다.

[0039] 상기 닭 판별 키트는 판별 대상이 되는 닭으로부터 채취한 DNA 시료를 더 포함할 수 있다.

[0040] 상기 불포화지방산 함량이 높은 닭의 유전자표식은 닭의 SCD 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형이 동형접합체

유전자형일 수 있고, 상기 동형접합체 유전자형은 AA형 또는 GG형, 일 예로, GG형일 수 있다.

[0041] 상기 탐지수단은 통상의 유전자표식을 탐지할 수 있는 수단일 수 있으며, 바람직하게는 PCR 반응, 제한효소 처리 반응 및 전기영동을 수행하여 유전자표식을 탐지할 수 있는 수단을 포함하는 것일 수 있다.

[0042] 구체적으로, 상기 탐지수단은 상기 DNA 시료 및 프라이머 세트를 이용하여 PCR 반응을 수행할 수 있는 수단; 상기 PCR 반응의 산물을 제한효소로 처리할 수 있는 수단; 및 상기 제한효소로 처리한 처리물을 전기영동하여 유전자형을 확인할 수 있는 수단을 포함하는 탐지수단일 수 있다. 상기 제한효소는 *AciI*일 수 있다.

[0043] 상기 전기영동하여 유전자형을 확인할 수 있는 수단은 아가로스 겔 또는 폴리아크릴아마이드 겔을 이용하여 전기영동한 후에, 상기 전기영동의 결과인 DNA 밴드의 수와 크기를 확인할 수 있는 수단일 수 있다.

[0044] 본 발명의 구체예에 있어서, 닭으로부터 채취한 시료의 PCR 반응산물을 제한효소로 처리한 결과를 전기영동한 결과, 닭의 SCD(*Stearoyl-CoA desaturase*) 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형이 동형접합체 유전자형인 경우, 밴드가 300 bp 내지 350bp 크기, 구체적으로 325 bp 내지 330 bp 크기의 밴드 및 120 bp 내지 160bp 크기, 구체적으로 135 bp 내지 145 bp 크기의 밴드가 2개 확인되거나, 밴드가 220 bp 내지 250bp 크기, 구체적으로 230 bp 내지 240 bp 크기의 밴드, 120 bp 내지 160bp 크기, 구체적으로 135 bp 내지 145 bp 크기의 밴드 및 80 bp 내지 100bp 크기, 구체적으로 90 bp 내지 95 bp 크기의 밴드가 3개 확인되는 것으로 확인될 수 있다.

[0045] 상기 결과로부터 일 예로 팔미톨레산이 다량 함유된 계육을 생산하는 육용계를 선택하고 싶은 경우, 220bp 내지 250bp 크기의 밴드, 120 bp 내지 160bp 크기의 밴드 및 80 bp 내지 100bp 크기의 밴드가 3개 확인되는 계육을 선택할 수 있다.

발명의 효과

[0046] 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 닭의 SCD 유전자의 단일염기다형을 분석하는 방법은 닭의 불포화지방산 함량에 대한 지표 역할을 하여 우수한 지방산 조성을 가진 닭을 쉽게 간편하면서도 신속하게 선별할 수 있으므로, 바람직한 지방산 조성을 가진 고품질 육질을 지닌 닭의 생산과 선별을 가능하게 할 수 있으므로, FTA 등 통상조약에 의해 국제적 경쟁력이 요구되는 사육농가의 경쟁력 향상과 능률 향상에 도움이 되어 육용계를 사육하는 농가의 수익성 향상 및 매출 증대에 이바지할 수 있을 것으로 평가된다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 실험대상 육용계로부터 채취한 닭의 계놈 DNA 중, 시퀀싱(sequencing)에 기초한 SCD 유전자 2번 엑손의 g.3728A>G 단일염기다형을 확인한 그래프로, 도 1a는 P2R로 명명한 육용계를 확인한 결과이고, 도 1b는 P2G로 명명한 육용계를 확인한 결과이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, 실험대상 육용계로부터 채취한 닭의 계놈 DNA 중 SCD 유전자 2번 엑손을 시퀀싱(sequencing)하여 정렬한 염기서열들이다. 상기 염기서열의 좌측은 샘플 즉, 채취한 육용계의 종류를 의미하고, 우측의 숫자는 위치(bp)를 의미한다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, 육용계의 SCD 유전자 2번 엑손을 본 발명의 프라이머를 이용하여 증폭하고, 효소처리한 결과(PCR-RFLP)를 나타낸 유전자형 분석 결과를 나타낸 사진으로, 좌측의 숫자는 크기(bp)를 나타내고, M은 마커(marker)를 의미하며, AA, GA 및 GG는 각각 염기다형을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 이하, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기 위하여 제조예 및 실시예를 제시한다. 그러나, 하기 제조예 및 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위하여 예시한 것을 뿐, 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 예들에 한정되는 것은 아니다.

실시예

[0050] Ross 육용계 95수를 동일 급식환경에서 28 주령에 도체중 1.6 Kg 이상이 될 때까지 사육하였다. 상기 28 주령째에 상기 육용계를 희생시킨 후, 넓적다리 근육을 분리하여, 상기 근육으로부터 얻어진 조직을 시료로 하여, DNA 추출 및 지방산 조성 분석을 수행하였다.

[0051] 또한, 상기 분석을 수행한 결과, 구체적으로 SCD 유전자형과 지방산 조성의 상관관계에 대한 통계분석은 SPSS

버전 17.0 프로그램(SPSS, USA)에서 GLM (일반적인 선형 모형)을 이용하여 수행하였다.

[0052] 상기 유전자형간의 유의성 확인은 Tukey HSD test로 수행하였고, 구체적으로 하기 계산식에 기재된 통계 모형을 사용하여 유전자형과 지방산 조성의 연관성을 분석하였다. 하기 계산식에서, Y는 샘플 i의 표현형 데이터 (지방산 조성)이며, μ 는 전체 평균이며, G는 샘플 i의 유전자형이고, ε 는 오차를 의미한다.

[0053] [계산식]

[0054]
$$Y_i = \mu + G_i + \varepsilon_i$$

[0055] 실시예 1. 지방산 분석

[0056] 상기 지방산 분석은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 우선, 상기 시료로부터 Folch 등(1957)에 의해 보고된 실험과정에 따라 클로로포름(chloroform)과 메탄올(methanol)이 부피비를 기준으로 2:1로 혼합된 혼합용액을 이용하여 전체 지질을 추출하였다. 또한, 지방산 메틸에스테르(FAME)는 BF3-메탄올(Sigma-Aldrich, USA)을 이용하여 추출한 지질로부터 HP-6890N 가스크로마토그래피를 사용하여 분리하였다.

[0057] 구체적으로, 상기 BF3-메탄올을 이용하여 추출한 지질을 오메가왁스(Omegawax) 320 모세관 컬럼(capillary column, 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m)에 균열비(split ratio)가 50 : 1인 균열 인렛(Split inlet, Supelco, USA)를 이용하여 주사하였다. 램프(ramp) 오븐의 온도는 다음과 같이 조절하였다. 우선, 150℃에서 3분 동안 유지시키고, 180℃에 이를 때까지 2.5℃/min으로 증가시킨 후, 5분 동안 유지시키고, 다시 220℃에 이를 때까지 2.5℃/min으로 증가시킨 후, 25 분 동안 유지시키는 방법으로 수행하였다. 상기 균열 인렛의 온도는 210℃로 조절하였다. 공기는 운반기체로서 0.7 mL/min의 흐름을 유지하였다.

[0058] 상기 분석 결과로부터 확인된 상기 육용계 95두의 평균 지방산 조성을 하기 표 1에 나타내었다. 하기 표 1은 분석된 평균 지방산 조성의 백분율과 표준편차를 나타낸 것으로, 하기 표 1의 SFA는 포화지방산을 의미하고, MUFA는 단가 불포화지방산을 의미하며, PUFA는 고도 불포화지방산을 의미한다.

표 1

[0059]

지방산	평균(%)	표준편차
Myristic acid (C14:0)	0.89	0.18
Myristolenic acid (C14:1)	0.19	0.07
Palmitic acid (C16:0)	24.27	1.13
Palmitoleic acid (C16:1)	4.58	1.07
Stearic acid (C18:0)	10.74	2.53
Oleic acid (C18:1)	37.62	3.59
Linoleic acid (C18:2)	16.90	1.54
α -Linolenic acid (C18:3)	0.64	0.15
Arachidic acid (C20:0)	0.09	0.03
Arachidonic acid (C20:4)	3.49	1.33
Docosahexaenoic acid (C22:6)	0.54	0.21
SFA	36.00	3.07
MUFA	42.41	4.46
PUFA	21.59	2.72

[0060] 상기 표 1에 나타낸 바와 같이, 육용계에서의 지방산 조성은 포화지방산의 수준이 쇠고기와 비교해 봤을 때 낮은 수준으로 나타나는 것을 확인하였다. 이와 관련하여, 포화지방산의 과다 섭취는 심장 혈관 질환을 유발할 수 있는 혈장콜레스테롤을 증진시키는 결과를 초래할 수 있으며, 특히, 라우르산(C12:0), 미리스트산(C14:0) 그 리고팔미트산(C16:0)과 같은 포화지방산들은 심혈관계 질병에 가장 유해하게 영향을 미치는 지방산들로 알려져 있으므로, 상기 포화지방산과 육용계의 유전자형과의 관련성을 검토하였다.

[0061] 실시예 2. 유전자형과 지방산의 연관성 분석

[0062] 상기 실시예 1에서 분석된 지방산 조성과 유전자형을 비교하기 위하여, 우선적으로 상기 95수 중 15수를 선택하

여, 상기 넓적다리 근육으로부터 DNA 샘플을 수득하여 단일염기다형을 확인하였다.

[0063] 구체적으로, 계놈 DNA 샘플은 근육 샘플에 대해 페놀추출을 수행한 후, 20 mg/ml 프로테이나제 K(proteinase K) 분해를 수행한 후, Prime Prep™ Genomic DNA Isolation Kit(GenNetBio, 대한민국)를 이용하여 genomic DNA를 추출하는 방법으로 수행하였다.

[0064] 상기 추출된 DNA 샘플을 주형으로 하고, 하기 표 2의 닭 SCD 유전자의 염기서열(GenBank Acc.No NC_006093)을 기초로 제작된 프라이머쌍을 프라이머로 이용하여, 하기 표 3의 조건으로 PCR 반응을 수행하였다. 상기 PCR 반응을 위한 PCR 반응액은 상기 각각의 계놈 DNA 시료 50 ng, 10X 버퍼 완충액(reaction buffer, 100 mM Tris-Cl, 400 mM KCl, 20 mM MgCl₂, GenetBio, 대한민국) Taq DNA polymerase, 10 mM dNTP 및 하기 표 2의 프라이머를 포함하였다. 상기 PCR 반응은 진앰프(GeneAmp) PCR 시스템 2700(Applied Biosystems, US) 또는 C1000™ 열사이클러(Thermal Cycler, BioRad, USA)를 사용하여 수행하였다. 상기 PCR 수행결과, 468 bp 크기의 단편이 증폭됨이 확인되었다.

표 2

[0065]

프라이머	서열(5' → 3')	서열번호
F	cccccagaaagaaaaagtcc	1
R	caaaaatcccaccaacaac	2

표 3

[0066]

단계(step)	온도	반응시간
First(1st) denaturation	94℃	10 minutes
Second(2nd) denaturation	94℃	30 seconds
Annealing	65℃	30 seconds
Extension	72℃	30 seconds
Cycle	go to 2nd denaturation	35 cycle
Final Extension	72℃	10 minutes

[0067] 상기 PCR 반응을 완료한 후에, 증폭 산물은 에티듐 브로마이드(EtBr, GenetBio, 대한민국)로 염색한 1.5% 표준 아가로스 젤에서 관찰하였다. 각 PCR 산물은 아큐프렙(AccuPrep) PCR 정제 키트(Bioneer, Korea)를 사용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 자동화된 3730 XL DNA 시퀀서(Applied Biosystems, USA)에 PCR 반응과 동일한 프라이머를 사용하여서 염기서열을 분석하였다. DNA 염기서열은 바이오에디트(BioEdit) 프로그램 ver. 7.00으로 분석하였으며(Tom Hall, Ibis Therapeutics, USA), 단일염기다형(single nucleotide polymorphism, SNP)은 전기영동다형 결과에 기초하여 확인하였다. 상기 확인한 결과를 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[0068] 상기 확인결과, 5개의 단일염기다형들이 SCD 유전자의 엑손(엑손 2번 및 4번)과 인트론(인트론 2번 및 5번)에서 확인되었다. 특히, 이 중 엑손 2번에서 확인된 단일염기다형을 선택하여 각 샘플에 따라 비교분석하였다.

[0069] 상기 분석한 결과를 도 1에 나타낸 바와 같이, SCD 유전자 엑손 2번에 위치한 g.37284A>G 단일염기다형은 제한 효소에 의해 인식될 수 있는 제한 부위(restriction site)를 포함하고 있어서 유전자형 분석이 용이한 것으로 확인되었고, PCR-RFLP 방법을 통해 특정 염기 위치에 특정 염기 즉, A 또는 G로 개체마다 구분될 수 있음이 확인되었다.

[0070] 또한, 도 2에 나타낸 바와 같이, 상기 증폭된 468 bp의 SCD 유전자의 PCR 증폭 산물을 *Ac*iI 제한효소를 사용하여 절단한 결과, 유전자형 AA 타입을 가지고 있는 개체는 328 bp와 140 bp 2개 조각으로 절단되었으며, 유전자형 GG 타입을 가지고 있는 개체는 236 bp, 140 bp와 92 bp의 3개의 조각으로 절단되는 것이 확인되었다.

[0071] 상기 각각 분석된 AA 타입, GG 타입 및 GA 타입의 닭의 근육 샘플에 대해 14개의 지방산 조성을 확인하여 유전자 다형성과 지방산 형질과의 상관관계 분석을 상기 통계분석방법을 이용하여 수행하였다.

[0072] 상기 수행결과를 하기 표 4에 나타내었다. 하기 표 4의 P-값은 유전적 다형성과 지방산 조성형질 사이의 표현형 평균의 차이를 의미한다. 또한, 하기 표 4는 분석된 각각의 지방산 조성의 백분율과 표준편차를 나타낸 것으로, 하기 표 4의 SFA는 포화지방산을 의미하고, MUFA는 단가 불포화지방산을 의미하며, PUFA는 고도 불포화지방산을 의미한다. 하기 표 4의 동일한 열에서 a 또는 b 등 상이한 위첨자를 가진 평균 값은 P<0.01 (Tukey's

test)에서 유의하게 상이함을 의미한다.

표 4

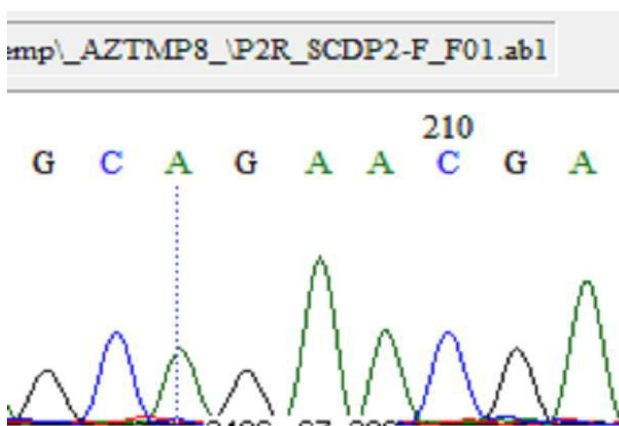
지방산 조성	g.37284A>G SNP in chicken SCD gene			P-값
	AA	GA	GG	
Myristic acid (C14:0)	0.91 ± 0.02	0.80 ± 0.05	0.91 ± 0.03	0.14
Myristolenic acid (C14:1)	0.19 ± 0.01 ^a	0.14 ± 0.02 ^b	0.21 ± 0.01 ^a	0.01**
Palmitic acid (C16:0)	24.05 ± 0.15 ^a	24.97 ± 0.33 ^b	24.52 ± 0.22 ^{ab}	0.02*
Palmitoleic acid (C16:1)	4.59 ± 0.14 ^{ab}	3.87 ± 0.32 ^a	4.84 ± 0.21 ^b	0.04*
Stearic acid (C18:0)	10.52 ± 0.34	12.33 ± 0.75	10.59 ± 0.49	0.88
Oleic acid (C18:1)	37.85 ± 0.49	36.88 ± 1.08	37.34 ± 0.70	0.67
Linoleic acid (C18:2)	17.05 ± 0.21	16.21 ± 0.46	16.68 ± 0.30	0.26
α-Linolenic acid (C18:3)	0.65 ± 0.02	0.65 ± 0.05	0.65 ± 0.03	0.91
Arachidic acid (C20:0)	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.25
Arachidonic acid (C20:4)	3.55 ± 0.18	3.55 ± 0.40	3.42 ± 0.26	0.91
Docosahexaenoic acid (C22:6)	0.54 ± 0.03	0.59 ± 0.06	0.52 ± 0.04	0.62
SFA ¹	35.57 ± 0.41 ^a	38.21 ± 0.91 ^b	36.11 ± 0.59 ^{ab}	0.03*
MUFA ²	42.63 ± 0.60	40.89 ± 1.34	42.39 ± 0.87	0.50
PUFA ³	21.79 ± 0.37	20.90 ± 0.82	21.47 ± 0.53	0.59

상기 표 4에 나타난 바와 같이, SCD 유전자의 g.37284A>G 단일염기다형은 미리스트올레산(C14:1), 팔미트산(C16:0), 팔미톨레산(C16:1) 그리고 포화지방산(SFA)과 연관되어 있음을 확인 할 수 있었다. 구체적으로, 단일염기다형 유전자형 중, 이형접합체 유전자형(GA)은 동형접합체 유전자형에 비하여, 팔미트산과 포화지방산이 확연히 증가되고, 미리스트올레산이 감소되는 것으로 확인되었다.

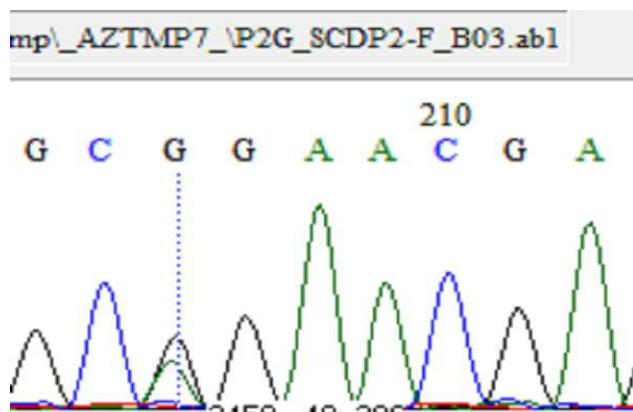
또한, 동형접합체 유전자형 중, GG를 가진 개체에서 팔미톨레산을 증가시키는 효과가 확인되었다. 상기 팔미톨레산은 유해한 콜레스테롤을 줄이는 좋은 효과를 가진 지방산으로 알려져 있으며, 혈관 내에 지방이 침착하는 것을 줄이고, 혈소판의 응집현상을 감소시키는 효과를 가지고 있다. 따라서, 건강에 이로운 육류 섭취와 관련하여, 닭의 SCD(Stearoyl-CoA desaturase) 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형이 동형접합체 유전자형 중, GG를 가진 개체를 선택하는 것은, 높은 팔미톨레산 함량을 가지고 있는 개체의 선발이란 점에서 바람직할 것으로 예상된다.

도면

도면1a



도면1b



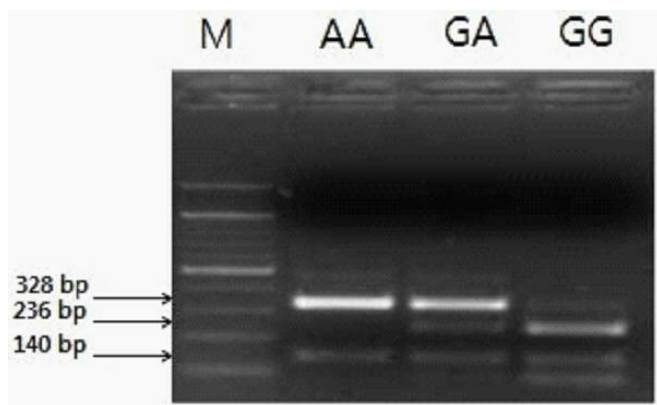
도면2

```

P2R  AATGGGAATGCCATCATGGAGAAGGACTTACTCAATCATGACGACGTGGCAGCAGAACGA 240
P2W  AATGGGAATGCCATCATGGAGAAGGACTTACTCAATCATGACGACGTGGCAGCAGAACGA 240
NCBI  AATGGGAATGCCATCATGGAGAAGGACTTACTCAATCATGACGACGTGGCAGCAGAACGA 240
P2G  AATGGGAATGCCATCATGGAGAAGGACTTACTCAATCATGACGACGTGGCAGCGGAACGA 240
P2L  AATGGGAATGCCATCATGGAGAAGGACTTACTCAATCATGACGACGTGGCAGCGGAACGA 240
P2Y  AATGGGAATGCCATCATGGAGAAGGACTTACTCAATCATGACGACGTGGCAGCGGAACGA 240
*****

```

도면3



서열 목록

- <110> Foundation of University-Industry Research Collaboration
- <120> A NEW PRIMER SET FOR IDENTIFYING FATTY ACID COMPOSITION IN
BROILER CHICKEN AND A METHOD OF SELECTING CHICKEN BY USING THE
SAID PRIMER SET
- <130> DP20120142
- <160> 2
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SCD-F

<400> 1

ccccccagaaa gaaaaagtcc

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SCD-R

<400> 2

caaaaatccc acccaacaac

20